Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Würzburg

Vorstand: Professor Dr.Dr.W.Neumann

Über die elektrophoretische Auftrennung von Bienengift

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n

verfaßt und der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilian Universität Würzburg
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
vorgelegt von

Gerda Ida Amend

aus

Wölchingen - Baden

Würzburg 1954

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Würzburg

Vorstand: Professor Dr.Dr.W.Neumann

Über die elektrophoretische Auftrennung von Bienengift

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n

verfaßt und der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilian Universität Würzburg
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
vorgelegt von

Gerda Ida Amend

aus

Wölchingen - Baden

Würzburg 1954

Referent: Professor Dr. Dr. W. N e u m a n n

Tag der mündl. Prüfung:

16. Nov. 1954

R. UNIV. BIBLIOTHEEK LEIDEN

Gedruckt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Würzburg

Meiner lieben Mutter
und dem Andenken meines
in Kriegsgefangenschaft verstorbenen Vaters
gewidmet

Inhaltsübersicht

A. Einleitung

B. Methodik

a) Geräte

b) Substanzen

c) Ausführung der Elektrophorese

C. Ergebnisse

a) Verhalten von elektrophoretisch getrenntem Bienengift bei der Amidoschwarzfärbung und Auswertung nach Grassmann.

b) Aminosäurenreaktionen von elektrophoretisch getrenntem Bienengift.

c) Vergleich der elektrophoretischen Wanderung von Bienengift mit der von Histamin.

d) Elektrophoretisches Verhalten von physikalisch vorbehandeltem Bienengift.

e) Gewinnung der elektrophoretisch getrennten Komponenten von Bienengift.

f) Minderung der Bernsteinsäuredehydrierung durch die elektrophoretisch getrennten Bienengiftfraktionen.

g) Verteilung der pharmakologischen und biochemischen Eigenschaften von Bienengift auf die beiden Fraktionen.

D. Zusammenfassung

E. Literaturnachweise

Für die Charakterisierung von Proteinen und Proteingemischen hat sich das elektrophoretische Verfahren als unentbehrlich erwiesen. Die Methode beruht auf der unterschiedlichen Wanderungsgeschwindigkeit geladener Teilchen im elektrischen Feld.

Ganz besondere Bedeutung hat diese von TISELIUS erschlossene Methode der elektrophoretischen Differenzierung für die Virus- und Fermentforschung und für die klinisch wichtige Analyse der Serum- und Plasmafraktionen erhalten, nachdem z.B. bei septischen und tuberkulösen Erkrankungen und bei pathologischen Vorgängen in der Leber und Milz und anderen Organsystemen sich charakteristische Veränderungen in der Eiweißzusammensetzung der Blutflüssigkeit abspielen. Auch zur Untersuchung der Zusammensetzung tierischer Gifte wurde diese Methode verwendet (GONCALVES u. POLSON, GONCALVES, JOUBERT u. HAIG; GONCALVES u. VIEIRA).

Bei der Methode von TISELIUS ist jedoch die Kompliziertheit und Kostspieligkeit seiner Apparatur von Nachteil. Die Trennung von elektrophoretisch beweglichen Substanzen kann auch einfacher durchgeführt werden, wenn man die elektrophoretische Wanderung auf Filtrierpapier vor sich gehen läßt. Grundlegende Versuche auf papierelektrophoretischem Gebiete wurden schon 1937/39 von KLOBUSITZKY und KÖNIG durchgeführt. Sie trennten Farbstoffgemische und Schlangengifte auf mit Elektrolyt-

lösung getränkten Filtrierpapierstreifen. Erst 10 Jahre später berichteten TURBA und WIELAND sowie CREMER und TISELIUS über Mikrotrennungen von Eiweißkörpern und Aminosäuren auf papierelektrophoretischem Wege.

Aufgabe vorliegender Arbeit sollte es sein, die von HABERMANN im Bienengift nachgewiesenen elektrophoretischen Komponenten quantitativ zu bestimmen und durch Aminosäurereaktionen auf ihre Zusammensetzung zu prüfen. Schließlich sollte eine präparative Auftrennung in größerem Umfang versucht und die erhaltenen Fraktionen auf ihre pharmakologischen und biochemischen Eigenschaften untersucht werden. Gleichzeitig sollte geprüft werden, ob und wie sich das elektrophoretische und färberische Verhalten von Bienengift bei Erhitzen und bei saurer oder alkalischer Reaktion ändert.

Seit der Durchführung der hier geschilderten Untersuchungen sind die Arbeiten über tierische Gifte im hiesigen Pharmakologischen Institut fortgeführt worden; eine Reihe von Veröffentlichungen darüber liegen in verschiedenen Zeitschriften vor. Auf 2 zusammenfassende Artikel wird am Schluß der vorliegenden Arbeit noch hingewiesen.

B. Methodik

Unsere Methodik der Papierelektrophorese war der von GRASSMANN und HANNIG beschriebenen sehr ähnlich.

a) Geräte

Die zur Papierelektrophorese benutzten Kammern waren aus Kunststoffen (Bakelit oder Plexiglas) hergestellt, 38 cm lang und 12 cm breit. Ein Deckel aus Glas schloss das Gerät dicht ab und wurde von uns mit einem Filtrierpapierblatt auf der Innenseite beklebt, um ein "Schwitzen" des Glases und Herabtropfen von Flüssigkeit auf den Streifen während der Elektrophorese zu verhindern. An den Schmalseiten waren die Kammern in einen Außenraum und einen Innenraum unterteilt, im Außenteil waren die Platinelektroden angebracht, in den Innenteil tauchten die Enden des Papierstreifens ein. Dazwischen lag eine kleine Öffnung, die mit Glaswolle locker verschlossen war. Der zur Aufnahme der Papierstreifen dienende Kunststoffsteg war herausnehmbar in dem Mittelteil der Kammer untergebracht.

Zum Auftragen der Substanz auf den Filtrierpapierstreifen verwendeten wir eine Spezial-Mikropipette mit einem Fassungsvermögen von 10 cmm.

b) Substanzen

1) Bienengift

Wir verwendeten in der Regel Gifte, die wir der Firma Heinr. Mack Nachf., Illertissen verdanken. In der Hauptsache benutzten wir Pikratgift$_{50}$ und gegen Ende der Versuchsreihe Pikratgift$_{51}$. Diese beiden Präparate stellen Hydrochloride der Proteinbestandteile des Giftes dar. Sie waren über eine Fällung mit Pikrinsäure aus Bienen-Rohgift gewonnen. In orientierenden Versuchen wurde auch eine nicht pikratgereinigte Bienengiftcharge 19/48 der Elektrophorese unterworfen. Die Gifte wurden im Verhältnis 1:10 in Aqua dest. oder physiologischer Kochsalzlösung gelöst. Es blieb bei den Pikratgiften kein Rückstand, während das Gift 19/48 nicht restlos löslich war.

2) Pufferlösungen

Bei der Herstellung der für die Elektrophorese geeigneten Pufferlösungen hielten wir uns an die Tabelle von MILLER und GOLDER (Tab. 1).

Wir verwendeten am häufigsten Phosphatpufferlösung vom p_H = 6,47. Weitere Versuche wurden mit Veronal- und Acetatpufferlösungen ausgeführt. Nach jedem "Lauf" wurden die Kammern umgepolt und nach je 5 Läufen wurden sie mit frischem Puffer gefüllt.

Eine Kontrolle des verwendeten Puffers im Jonometer ergab nach 5 Läufen nur eine sehr geringe Verschiebung des p_H-Wertes zum Alkalischen.

Tabelle 1

Puffertabelle nach MILLER und GOLDER

Menge auf 2 l - Jonenstärke 0,2
(Jonenstärke 0,1:32,0 NaCl statt 72,0)
Lösungsmittel in ccm

P_H	5 m NaCl	1 m Glycin 1 m NaCl	2 n HCl	2 n NaOH	2 m Na-acetat	3,5 m Essig-säure	0,5 m $Na_2HPO_4^2$	4,0 m NaH_2PO_4	0,5 m Veronal-Na
2,0	72,0	10,6	14,7						
2,5	72,0	22,8	8,6						
3,0	72,0	31,6	4,2						
3,5	72,0	36,6	1,7						
4,0	72,0				20,0	33,7			
4,5	72,0				20,0	11,5			
5,0	72,0				20,0	3,7			
5,5	72,0				20,0	1,2			
6,0	72,0						9,2	6,6	
6,5	72,0						16,6	3,7	
7,0	72,0						22,7	1,6	
7,5	72,0						24,3	0,5	
8,0	72,0		10,4						80,0
8,5	72,0		5,3						80,0
9,0	72,0		2,0						80,0
9,5	72,0	34,5		2,7					
10,0	72,0	28,8		5,6					
10,5	72,0	23,2		8,4					
11,0	72,0	19,6		10,2					
11,5	72,0	17,6		11,2					
12,0	72,0	15,2		12,4					

3) Filtrierpapier

In der Hauptsache verwendeten wir 18 cm lange und 4 cm breite Streifen aus Whatmanpapier Nr.1, das eine gute Auftrennung gestattete. Mehrmals benutzten wir auch Whatman 1 in 9 cm breiten Streifen, wovon nur ein Streifen in die Kammer eingelegt wurde. Auf diesen breiten Streifen konnte man ähnlich wie bei der Papierchromatographie mehrere Substanzen nebeneinander wandern lassen.

c) Ausführung der Elektrophorese

Zunächst wurde mit dünnem Bleistift der Startstrich quer über den Streifen gezogen. Wir legten ihn etwas anodenwärts von der Mitte des Streifens an, da, wie wir bereits aus Versuchen von HABERMANN wußten, Bienengift ganz überwiegend kathodisch wandert. An den Streifenenden wurden Anode und Kathode markiert, dann der Streifen rasch durch Pufferlösung gezogen und durch Auflegen auf eine Filtrierpapierunterlage die überschüssige Flüssigkeit aufgesaugt. Dieses Aufsaugen mußte ziemlich vollständig erfolgen, da auf zu feuchtem Papier keine gute Aufteilung erfolgte. Die Startlinie wurde zusätzlich mit einem schmalen Papierstreifen abgetupft.

Sofort wurde der Streifen dann auf den der Kammer entnommenen Steg aufgespannt und das Gift aufgetragen. Mit einer Spezialpipette brachten wir 0,5-1 mg (= 0,005-0,01 cm^3) Bienengift durch Hin- und Herbewegen

der Pipette auf der Markierungslinie auf. Der Steg wurde dann in die mit Pufferlösung gefüllte Kammer eingebracht, dieselbe mit dem Deckel verschlossen, wobei es uns empfehlenswert erschien, an der Anode wegen der Chlorgasentwicklung einen Spalt offen zu lassen, um die Einwirkung solcher Elektrolysen-Produkte auf die zu trennenden Substanzen nach Möglichkeit zu vermeiden. Auch auf die Einhaltung einer niedrigen Raumtemperatur (10-14°) achteten wir, um Verdunstungsfehler zu umgehen.

Nach dem Beschicken der Kammern wurden diese 10 Minuten später an 110 Volt Gleichstrom angeschlossen. Die Elektrophorese setzte ein. Schon vor dem Einschalten des Stromes konnten wir eine Verschiebung der aufgetragenen Substanz beobachten; denn von den Streifenenden her diffundierte Pufferlösung gegen die Mitte der Streifen hin und bewirkte eine solche Verlagerung, auch wenn man darauf achtete, daß in den Elektrodenkammern die Pufferlösung das gleiche Niveau einnahm und so eine Heberwirkung ausgeschlossen war. Der Streifen erwärmte sich durch den Stromdurchfluss, und das Lösungsmittel trocknete geringgradig ein. Ein Elektrophoreseversuch bei 220 Volt und Jonenstärke 0,2 scheiterte, weil der Streifen austrocknete und die Substanz "ausgesalzen" wurde.

Nicht immer waren, besonders anfänglich, die Ergebnisse hinsichtlich der Aufteilung und der Trennschärfe

zufriedenstellend, so daß wir erst über Umwege zu oben angeführter Methode gekommen sind. Wir übten zunächst ein Verfahren, wobei wir das Gift auf den noch trockenen Streifen aufbrachten, und dann erst die Pufferlösung durch eine Spray-Vorrichtung aufstäubten, wobei aber eine gleichmäßige Durchfeuchtung des Streifens Schwierigkeiten bereitete. Bei anderen Versuchen trugen wir ebenfalls auf den trockenen Streifen auf und ließen anschließend die Pufferlösungen aus feuchten Filterpapieren in den Streifen eindiffundieren. Auch hierbei waren die Ergebnisse nicht zufriedenstellend, so daß wir schließlich auf das von GRASSMANN angegebene Verfahren zurückkamen. Nach 8-14 Stunden Laufzeit unterbrachen wir und entwickelten den Streifen in geeigneter Weise.

C. Ergebnisse

a) Verhalten von elektrophoretisch getrenntem Bienengift bei der Amidoschwarzfärbung und Auswertung nach GRASSMANN.

Nach der Elektrophorese wurden die Streifen mit den Rahmen aus den Kammern herausgenommen, zunächst eine halbe Stunde an der Luft und dann hängend im Trockenschrank bei 100° getrocknet.

1) Fluoreszenz von elektrophoretisch getrenntem Bienengift.

Betrachteten wir unter der Quarzlampe einen getrockneten Elektrophoresestreifen mit Bienengift, so leuchteten kathodenwärts zwei stahlblau fluoreszierende

Komponenten auf. Die schnellere Fraktion I leuchtet intensiver als die Fraktion II. Wir möchten hier nebenbei auf das auffällige Verhalten der Fluoreszenz von elektrophoretisch aufgetrenntem Bienengift 19/48 hinweisen, das verunreinigt, wahrscheinlich zersetzt und biologisch unwirksam war und auch keine Färbbarkeit mit Amidoschwarz zeigte. Dagegen stellten sich mit Ninhydrin mindestens drei Fraktionen dar in violettroter Farbe und außerdem unter der UV-Lampe hell- und dunkelblau fluoreszierende Streifen, die sich aber mit den breiteren Ninhydrinstreifen nicht deckten.

2) Färbung von elektrophoretisch getrenntem Bienengift nach GRASSMANN mit Amidoschwarz.

Die unter der UV-Lampe lokalisierten Fraktionen ließen sich nach GRASSMANN mit Amidoschwarz 10 B der Firma Bayer, Leverkusen sichtbar machen. Die Streifen kamen in ein Färbebad, das wir aus 6 g Amidoschwarz, 180 ccm Methanol und 20 ccm Eisessig herstellten. Unter ständigem 10 Minuten dauerndem Umschütteln erfolgte die Färbung. Das Färbemittel konnte bis zum Verbrauch verwendet werden. In mehreren Eisessig-Methanol-Bädern (9:1), von denen die letzten nur noch schwach gefärbt sein durften, erfolgte im Verlauf von etwa vier Stunden das Auswaschen der Streifen. Das letzte Bad wurde nahezu farblos gehalten, damit sich die nicht eiweißtragenden Stellen des Papiers möglichst weitgehend entfärbten, da sonst im Photometer die Eigenextinktion des Papiers gestört hätte. Nach der Färbung

erschienen zwei Bienengiftfraktionen F I und F II deutlich dunkelblau, eine "Vorfraktion" F 0 dagegen nur angedeutet blassblau.

3) Photometrische und planimetrische Auswertung der gefärbten Bienengiftstreifen nach GRASSMANN.

Das photometrische Verfahren liefert Kurven, die nach WIEDEMANN (Konstruktion von GAUSS'schen Kurven) oder TISELIUS (Unterteilung der Kurven durch in den Minima gezogenen Senkrechten) ausgewertet werden können. Die Streifen wurden im durchfallenden Licht photometriert und mußten zu diesem Zweck erst durch Einbetten in ein Lösungsmittel vom Brechungsindex der Papierfaser (Bromnaphtalin + Paraffinöl, n = 1,51) durchsichtig gemacht werden. Es war ein vollständiges Durchtränken des Streifens und ein blasenfreies Einlegen zwischen die zwei Glasplatten des Auswertgerätes erforderlich. Nun wurde die Extinktion des Streifens millimeterweise durchgemessen und dann auf Millimeterpapier aufgetragen. Die erhaltenen Kurven wurden planimetrisch ausgemessen und der prozentuale Anteil der Fraktionen errechnet.

Tabelle 2

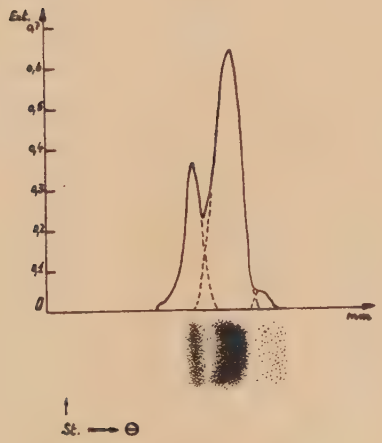
Quantitative Verteilung der Färbbarkeit mit Amidoschwarz im elektrophoretisch getrennten Bienengift.

	Fraktion 0	Fraktion I	Fraktion II
Streifen 1	2,0%	70,1%	27,7%
Streifen 2	8,2%	69,0%	22,7%
Streifen 3	3,3%	76,9%	19,7%
Mittelwert	4,5%	72,0%	23,5%

Abbildung 1

Papierelektrophoretische Auftrennung

von Pikratgift 50·



0,5 mg Bienengift
Laufzeit 14 Stunden bei 140 Volt, t = 11°,
Phosphatpuffer p_H = 6,47
Jonenstärke 0,2
Färbung mit Amidoschwarz
St = Start
Auswertung nach GRASSMANN
Schnellere Fraktion 70,1%, langsamere Fraktion
26,0% vom Gesamteiweiß.

b) Aminosäurereaktionen von elektrophoretisch getrenntem Bienengift ("Pikratgift").

Es erhob sich die Frage, ob es gelingen würde, die erhaltenen Bienengiftfraktionen mit den bekannten Aminosäurereagentien auf dem Papier zu färben. GLICK gibt eine Übersicht für den Nachweis von Aminosäuren in Gewebsschnitten. Wir versuchten, diese Methode auf den Aminosäurennachweis in Filtrierpapier zu übertragen.

1) Argininfärbung nach SAKAGUCHI (in Anlehnung an GLICK).

Der getrocknete Streifen wurde eine Minute lang in äthylalkoholisches α-Naphtol (0,1%) eingelegt, dann herausgenommen und abtropfen lassen. Hierauf wurde er einige Male durch 0,15 n NaOCl in 0,05 n NaOH (frisch angesetzt) gezogen, wieder abtropfen lassen und dann durch 20%igen Harnstoff in 0,05 n NaOH gezogen. Beide Fraktionen färbten sich weinrot. Jedoch schwand die Färbung sehr bald und entsprechend der schwächeren Fraktion II dort zuerst.

2) Tryptophannachweis durch Fluoreszenz.

NEHER und WETTSTEIN machten bei der Färbung von Steroiden auf Filtrierpapier die Nebenbeobachtung, daß von 23 untersuchten Aminosäuren nur das Tryptophan mit 20%iger wässriger Phosphorsäurelösung in der Hitze eine Fluoreszenz zeigte. Wir versuchten, auf diese Weise auf

dem Papier die Bienengiftfraktionen auf diese Aminosäure zu prüfen. Da aber das Papier unter Einwirkung von Phosphorsäure stark leidet und die Fluoreszenz relativ schwach ist, benutzten wir Antimontrichlorid in Chloroform als Reagens auf Tryptophan; denn nach Untersuchungen von HABERMANN ergibt von 17 untersuchten Aminosäuren nur Tryptophan positive Reaktion mit Antimontrichlorid.

Wir tränkten einen getrockneten Streifen mit gesättigter Lösung von Antimontrichlorid in Chloroform, erhitzten im Brutschrank kurz auf 100° und betrachteten dann den im sichtbaren Licht an der Stelle der beiden Fraktionen schwach bräunlich gefärbten Streifen unter der UV-Lampe, wo die Fraktionen mit intensiv zitronengelber Fluoreszenz erschienen. In anderen Fällen war die Fluoreszenz mehr bläulich oder mehr grünlich.

3) Tyrosinfärbung mit MILLONS Reagens (in Anlehnung an HOPPE-SEYLER-THIERFELDER).

Wir lösten metallisches Quecksilber in doppeltem Gewicht Salpetersäure (d = 1,42), fügten das doppelte Volumen aqua dest. dazu und ließen die Lösung einige Stunden stehen. Dann wurde der Streifen durch die Lösung gezogen und vorsichtig erhitzt. Es kam zu einer vorwiegend gelb-orangenen Färbung beider Fraktionen. Die spezifischere Rotfärbung blieb aus. Eine

von uns angesetzte Verdünnungsreihe des Reagens mit Tyrosin in verschiedenen Reagenzgläsern klärte diesen Effekt dahin auf, daß bei hoher Konzentration des Reagens eine Gelbfärbung auftritt, die bei steigender Verdünnung des Reagens mit Wasser von gelb über blassrosa, rosa zur Rotfärbung übergeht.

Verdünnungsreihe:

1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64
gelb	hell-gelb	blass-rosa	rosa	rot	rot

---

4) Ninhydrinfärbung.

Wir verwendeten 0,5%ige Ninhydrinlösung in 100 ccm-Methanol + 0,5 ccm Eisessig. Der Streifen wurde durchgezogen und bei 90-100° im Brutofen gehalten, bis die Farben deutlich hervortraten. Beide Fraktionen färbten sich rotbraun. Zusätzliche Komponenten waren nach Ninhydrinfärbung nicht zu sehen.

c) Vergleich der elektrophoretischen Wanderung von Bienengift mit der von Histamin.

Geringe Mengen von Histamin sind im Bienengift zu erwarten (NAGAMITU, REINERT, TETSCH u. WOLFF, ACKERMANN u. MAUER). Bei der Untersuchung der pharmakologischen Wirkungen von Bienengift und Bienengiftfraktionen muß daher geprüft werden, ob in den benutzten Präparaten etwa Histamin enthalten ist. Wir stell-

ten uns die Aufgabe, durch Papierelektrophorese im Pikratgift eventuell noch vorhandenes Histamin vom Eiweiß zu trennen und mit Ninhydrin nachzuweisen.

Zur Kontrolle unterwarfen wir auf breiten Filtrierpapierstreifen Pikratgift neben Histamin und neben einer Mischung aus beiden der Elektrophorese. Die Mischung trugen wir auf folgende Weise auf: Wir lösten 25 mg Histamindihydrochlorid in 0,25 ccm aqua dest. und stellten mit gesättigter Sodalösung auf ein p_H von 6-7 ein. 10 cmm der so bereiteten Histaminlösung und 0,7 mg Bienengift wurden zusammen auf den Startstrich aufgetragen. Nach etwa 3stündiger Wanderung beendeten wir den Lauf, trockneten die Streifen in gewohnter Weise und färbten sie mit Ninhydrin an. Bei der Mischung aus Pikratgift und Histamin war nach 3 Stunden Histamin aus dem Komplex der Eiweißkörper des Bienengifts herausgewandert. Es zeichnet sich gegenüber den Eiweißkörpern durch schnellere Wanderung und durch eine mehr bräunliche Farbe nach Ninhydrinfärbung aus. Dagegen war beim Pikratgift ohne Histaminzusatz nichts herausgewandert.

d) Elektrophoretisches Verhalten von physikalisch und chemisch vorbehandeltem Bienengift.

Es erschien uns von Interesse, das Verhalten von physikalisch und chemisch vorbehandeltem Bienengift bei der Elektrophorese zu untersuchen. Säure und Lauge

ließen wir bei normalen und bei Siedetemperaturen auf Bienengift einwirken.

1) Erhitzen von Bienengift.

Kurzdauerndes Erhitzen (10 Minuten) einer 10%igen Bienengiftlösung im kochenden Wasserbad änderte nichts an der elektrophoretischen Auftrennung des Giftes. Erhitzen über eine Stunde führte nur zu geringer Abnahme der Trennschärfe der Fraktionen.

2) Erhitzen von Bienengift mit Säure.

Wir lösten 10 mg Bienengift in 100 cmm aqua dest., versetzten mit 50 cmm n/2 HCl und erhitzten eine Stunde lang in siedendem Wasserbad (98^{o}). Dann wurde mit 50 cmm n/2 NaOH neutralisiert und bis zum Auftragen im Eisschrank aufbewahrt. Es zeigte sich eine geringe Abschwächung in der Trennschärfe der Fraktionen.

3) Erhitzen von Bienengift mit Lauge.

9,7 mg Bienengift in 10%iger Lösung ergaben mit 4,85 ccm n/2 NaOH einen dicken Niederschlag. Nach einstündigem Erhitzen wurde mit 4,85 ccm n/2 HCl neutralisiert, wobei Schwefelwasserstoff entwich (Geruch!). Es empfahl sich hierbei ein geringer Überschuss von HCl, weil die Auftrennung in Gegenwart von Lauge beeinträchtigt ist. Außerdem ist eine größere Verdünnung vorteilhaft, weil sonst die Lösung nur sehr schwierig mit der Pipette aufziehbar ist. Das elektrophoretische Bild wurde durch Erhitzen mit Lauge völlig verwischt.

4) Stehenlassen von Bienengift mit Lauge.

Bei einstündigem Stehenlassen von Bienengift mit Lauge (Konzentration wie bei 3) erhielten wir bei ca. 20-22° bei der elektrophoretischen Untersuchung nur eine geringe Einbuße in der Trennschärfe der Fraktionen.

e) Gewinnung der elektrophoretisch getrennten Komponenten von Bienengift.

Wir trennten insgesamt 45 mg Bienengift auf zahlreichen Streifen elektrophoretisch auf und schnitten die durch Fluoreszenz lokalisierten Fraktionen aus den getrockneten Papierstreifen aus. Die Papierstücke wurden nach Fraktionen getrennt, mit je 90 ccm Wasser eluiert (HABERMANN), wobei Fraktion I stärker schäumte als Fraktion II. Anschließend wurde abgesaugt und mit Pikrinsäure in Substanz nahezu gesättigt. Fraktion I fiel als dicker, flockiger, gelbbrauner Niederschlag aus, Fraktion II als mehr graufarbener, krümeliger Niederschlag. Die Pikratfällung blieb 2 Stunden im Eisschrank, wurde dann abzentrifugiert und mit salzsaurem Aceton (0,2 ccm Salzsäure (d = 1,19): 25 ccm Aceton) zweimal gewaschen. Hierbei zeigten sich neben der weißlichen Hauptmenge bräunliche Beimengen ungeklärter Art. Der gelbliche Gesamtrückstand ließ sich mit Wasser aus dem Zentrifugenglas herausspülen und im Vakuum eindunsten.

f) Minderung der Bernsteinsäuredehydrierung durch die elektrophoretisch gewonnenen Bienengiftfraktionen.

Die elektrophoretisch gewonnenen Fraktionen von Bienengift wurden im hiesigen Institut daraufhin untersucht, welche Wirkungen des Pikratgiftes der einen oder der anderen Fraktion zukamen. Im Rahmen dieser Untersuchung sollten wir klären, welche der beiden Fraktionen die Minderung der Bernsteinsäuredehydrierung verursacht, die von FLECKENSTEIN u. Mitarb. als Bienengiftwirkung zuerst beobachtet worden ist.

Die Aktivität der Bernsteinsäuredehydrase wurde im Rinderhirnhomogenat nach SCHOETENSACK (Einzelheiten bei TIMMERMANN u. SEIFERT) bestimmt. Als Indikator diente Triphenyltetrazoliumchlorid, welches bekanntlich in Gegenwart von Bernsteinsäure durch das Ferment zu rotem Formazan reduziert wird.

Ergebnis: Fraktion I brachte unter den bei SEIFERT geschilderten Bedingungen bei einer Endkonzentration von 1:250 000 eine Einschränkung der Reduktion von TTC um 39%
(Mittelwert aus 3 Versuchen).

Fraktion II brachte bei einer Endkonzentration von 1:250 000 eine Einschränkung der Reduktion von TTC um 67,5%
(Mittelwert aus 3 Versuchen).

Also fand sich bei diesen ersten Versuchen die dehydrasenhemmende Wirkung von Bienengift ganz überwiegend in Fraktion II.

g) Verteilung der pharmakologischen und biochemischen Eigenschaften von Bienengift auf die beiden Fraktionen.

Folgende Tabelle faßt kurz die Verteilung der Wirkungen von Bienenpikratgift auf die beiden von uns hergestellten Fraktionen zusammen. Die Untersuchungen wurden im Anschluß an die vorstehend geschilderte Gewinnung ausreichender Mengen der beiden Fraktionen von HABERMANN, z.T. mit JORDAN ausgeführt; über die Untersuchung der Minderung der Bernsteinsäuredehydrierung wurde oben schon berichtet.

Tab. 3

Verteilung der pharmakologischen und biochemischen Eigenschaften von Bienenpikratgift auf die beiden elektrophoretischen Fraktionen.

Wirkung	F I	F II
Lecithaseaktivität	-	++
Hemmung der Eidottergerinnung	-	++
Thrombokinaseabbau	-	++
Minderung der Bernsteinsäuredehydrierung im Rinderhirnhomogenat	(+)	++
Direkte Hämolyse	++	+
Muskelwirkung	++	(+)
Herzwirkung	++	(+)
Lokaltoxizität	++	(+)
Allgemeintoxizität	++	?
Erregung des isolierten Meerschweinchendarmes	++	+

D. Zusammenfassung.

Aufgabe vorliegender Arbeit war die papierelektrophoretische Auftrennung von Bienengift ("Pikratgift"), das z.T. einer chemischen oder physikalischen Vorbehandlung unterworfen worden war, und die Klärung, wie sich die sogen. Dehydrasenhemmung auf die Fraktionen verteilt.

Das untersuchte Gift teilte sich bei der Papierelektrophorese unter bestimmten, oben unter B. näher genannten Bedingungen in zwei Hauptfraktionen und eine schwache Vorfraktion, deren Mengenverhältnisse mit Hilfe der Amidoschwarzfärbung und photometrisch-planimetrischen Auswertung nach GRASSMANN ermittelt wurden.

Einstündiges Erhitzen sowie Stehenlassen mit Lauge hatte nur geringe Abnahme der Trennschärfe zur Folge, während Erhitzen mit Säure und vor allem mit Lauge (wobei H_2S abgespalten wurde) zu starker Verwischung des elektrophoretischen Bildes führte.

Histamin konnte in dem untersuchten Pikratgift nicht nachgewiesen werden, dagegen wurde zugesetztes Histamin nach Elektrophorese leicht wiedergefunden.

Die elektrophoretischen Komponenten I und II von Bienengift lassen sich mit Wasser eluieren und über eine Pikratfällung in Substanz gewinnen.

Beide Fraktionen sind auf dem Papier mit Ninhydrin färbbar. Sie geben positive Reaktionen mit Sakaguchi's

Reagens (Arginin) und mit gesättigter Antimontrichloridlösung in Chloroform (Tryptophan); mit Millons Reagens entsteht eine Gelbfärbung.

Fraktion II mindert die Bernsteinsäuredehydrierung im Rinderhirnhomogenat erheblich stärker als Fraktion I.

Eine tabellarische Übersicht über die Verteilung der pharmakologischen Wirkungen auf die gewonnenen Komponenten von Pikratgift wird gegeben.

Die Untersuchungen wurden im Wintersemester 1951/52 ausgeführt. Ein Teil der Befunde wurde sofort im Rahmen einer vorläufigen Mitteilung von NEUMANN, HABERMANN und AMEND über die papierelektrophoretische Auftrennung tierischer Gifte veröffentlicht, wobei gleichzeitig über Versuche mit Schlangengiften berichtet wurde. Einen Überblick über weitere Arbeiten des hiesigen Instituts über tierische Gifte bieten 2 Aufsätze von NEUMANN (a, b).

Herrn Professor Dr.Dr.W. N e u m a n n
möchte ich für die Überlassung der Arbeit und
das freundliche Entgegenkommen, an seinem Institut
zu arbeiten, meine größte Dankbarkeit ausdrücken.

Herrn Dr. E. H a b e r m a n n danke ich für die
freundliche Anleitung bei meiner Arbeit.

E. Literaturnachweise.

ACKERMANN,D. u.H.MAUER — Pflügers Arch.Physiol.247,623(1943)

CREMER,H.J. u.A.TISELIUS — Biochem.Z.320,273(1950)

FLECKENSTEIN,A. — Arch.exp.Path.Pharmakol.210,380(1950)

GLICK,D. — Techniques of Histo- and Cytochemistry, New York (1949)

GONCALVES,M. u.A.POLSON — Arch.Biochem.13,253-259(1947)

GONCALVES,M. u.VIEIRA — An.acad.brasil.Sci.22,141-150(1950)

GRASSMAN,W. u.K.HANNIG — Dtsch.med.Wschr.76,33(1951)
Naturwiss. 38,200(1951)
37,496(1950)

HABERMANN,E. — näher zit.bei NEUMANN u. HABERMANN Arch.exp.Path.Pharmakol.222,367(1954)

HOPPE-SEYLER-THIERFELDER — Physiol.Chem.Analyse, Springer Berlin (1924)

JORDAN,G. — Dissertation Würzburg 1952

JOUBERT,F.J., A.D.HAIG u. A.POLSON — Biochemic.J.40,265(1946)

KLOBUSITZKY,D.v. u.P.KÖNIG — Arch.exp.Path.Pharmakol.192,271(1939)

MILLER,L.G. u.R.A.GOLDER — Arch.Biochem.29,420-423(1950)

NAGAMITU,G. — Ber.ges.Physiol.95,128(1936)

NEHER,R.u.A.WETTSTEIN — Helv.chim.Acta 35,276-283(1952)

NEUMANN,W. — a) Ber.Physikal.-med.Ges.Würzburg 66,166(1954)
b) Naturwiss.41,322-326(1954)

REINERT,M. — Festschrift E.Barell, Basel 1936, S. 407

SCHOETENSACK,W. — Arch.exp.Path.Pharmakol.218,107(1953)

SEIFERT,S. — Dissertation Würzburg 1954

TETSCH,Ch. u.K.WOLFF — Biochem.Z.288,126(1936)

TIMMERMANN,W.D. — Dissertation Würzburg 1951

TURBA,F. — Naturwiss. 37,93(1950)

WIEDEMANN,E. — Schweiz.med.Wschr.74,566(1940)
75,224(1945)
Helvet.chim.Acta 30,108, 639, 648, 892(1947)
Helvet.chim.Acta 31,40,2037(1948)

WIELAND,Th. — Angew.Chem. 60,313(1948)
62, 31(1950)

Lebenslauf

Am 8.12.1922 wurde ich als Tochter des Rektors Wilhelm Amend und seiner Ehefrau Ida, geborene Wabel, in Wölchingen bei Boxberg geboren.

Nach 5jährigem Besuch der Volksschule trat ich Ostern 1935 in die Oberrealschule Tauberbischofsheim ein, und im Herbst 1935 wechselte ich in die Hans Thoma Oberschule Mannheim über, wo ich im April 1942 das Abitur ablegte. Im gleichen Jahr wurde ich zum einjährigen Arbeits- und Kriegshilfsdienst verpflichtet.

1943 begann ich an der Universität Heidelberg mit dem Studium der Medizin. Ich studierte dort 2 Semester. Nach Kriegsende nahm ich erst 1948 mein Studium an der Universität Würzburg wieder auf, wo ich im Oktober 1950 das Physikum ablegte und im Oktober 1954 das Studium mit dem medizinischen Staatsexamen beendete.

Ich versichere ehrenwörtlich, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig verfaßt und außer der angegebenen Literatur keine weiteren Hilfsquellen benutzt habe.

Ich versichere ehrenwörtlich, daß ich bisher von keiner anderen Seite ein Dissertationsthema zur endgültigen Bearbeitung erhalten habe.

Ida Amend

RUDOLF BAEHR DRUCK- UND WERBETECHNIK
WÜRZBURG